Études sur un lait fermenté comestible

LE « LEBEN » D'ÉGYPTE

PAR MM.

EDOUARD RIST
Ancien interne des hôpitaux
de Paris.

ET

JOSEPH KHOURY
Ancien préparateur de chimie
à l'École de pharmacie
de Montpellier.

Sous le nom de *leben raïb* ou tout simplement de *leben* dans l'Orient arabe, de *yaourte* en Grèce et en Turquie, on désigne un lait caillé spécial, dont l'usage alimentaire est universellement répandu parmi les populations levantines. En Égypte, on produit le *leben* au moyen du lait de buffle, de vache ou de chèvre. Chaque famille fabrique le sien, et en conserve un peu, en guise de levain, pour provoquer, au fur et à mesure des besoins, la fermentation de nouvelles quantités de lait frais.

L'opération s'accomplit de la manière suivante : le lait est d'abord porté à l'ébullition, puis versé dans des jattes où on le laisse refroidir. Lorsqu'il a atteint la température de 40° environ, on l'ensemence avec un peu de vieux leben, auquel on donne le nom de *roba*. Au bout de six heures en moyenne en été — un peu plus en hiver — le lait est pris. Il forme un caillot assez floconneux, blanc, d'où exsude du sérum en petite quantité. C'est alors un mets d'un goût aigrelet, sucré, frais et réellement fort agréable, d'un arome *sui generis*. Il est très apprécié des indigènes et on le sert même souvent sur les tables européennes.

Si on laisse la fermentation se prolonger, l'acidité augmente, et, au bout de 2 ou 3 jours le leben est immangeable.

Le leben se fabrique en Égypte, de la manière que nous venons d'indiquer, depuis des siècles. Il en est fait mention par les auteurs les plus anciens; outre sa popularité comme ali-

ment, il a joué et joue encore un rôle prépondérant dans la médecine arabe. Mais nous ne savons — pour n'avoir pas eu l'occasion de les comparer — si les lebens de Syrie et d'Arabie, si même les yaourtes turques et grecques sont absolument identiques au mets égyptien. Au moment où nous achevions cette étude, nous avons pu constater, à la lecture de la fort intéressante thèse de M. Arnold[1], que le leben fabriqué par les indigènes d'Algérie est très différent de celui qu'on mange en Égypte, et que sa fermentation est due à d'autres microorganismes. Il est fort probable qu'il se fabrique encore ailleurs d'autres variétés de leben. Les faits que nous exposerons dans le cours du présent mémoire se rapportent donc exclusivement au leben d'Égypte.

I

L'analyse chimique de différents échantillons de leben nous a fait voir que son acidité était due en grande partie à la présence de l'acide lactique, et qu'il contenait toujours une certaine quantité d'alcool, dont la production, assez limitée, ne s'accompagnait d'ailleurs d'aucune effervescence. Il s'agissait donc d'une fermentation complexe, analogue à celle du képhir, et dont il pouvait être intéressant de faire l'étude détaillée.

De nombreux échantillons, de provenances très diverses, examinés au microscope après coloration par le violet de gentiane en solution hydro-alcoolique ou par la fuchsine de Ziehl à froid, nous ont toujours donné des images identiques sous l'objectif. Parmi les flocons de caséine et les gouttelettes de beurre, on remarque de nombreux microorganismes qui appartiennent à cinq types distincts :

I. — Un bacille assez gros, à bouts carrés, se mettant volontiers en chaînettes de 5 à 10 éléments, chaînes qui s'incurvent légèrement en arc et ont une tendance à se grouper entre elles parallèlement, par faisceaux.

II. — Un bacille à peu près aussi long, mais beaucoup plus grêle, se montrant toujours par éléments isolés.

III. — Un diplocoque à grains un peu aplatis, ayant une

1. Montpellier, 1899.

certaine ressemblance morphologique avec le gonocoque.

IV. — Une levure à gros grains ovoïdes, trapus.

V. — Une levure beaucoup plus allongée, en moyenne quatre fois aussi longue que large.

Sauf dans des laits caillés datant de plus d'une semaine, nous n'avons jamais aperçu de microorganismes d'un autre type. L'ébullition préalable tue-t-elle tous les germes contenus dans le lait frais? Et la couche épaisse de crème qui se forme à la surface des jattes où se fait la fermentation suffit-elle à préserver le lait des germes atmosphériques? Ou bien faut-il supposer que la présence des microorganismes spécifiques du leben est un obstacle au développement d'autres espèces? C'est une question que nous n'avons pas cherché à résoudre.

Sur des préparations de sérum, en gouttes pendantes, nous n'avons jamais noté aucun mouvement spontané de ces organismes. Ils se colorent très bien, tous cinq, par la méthode de Gram, ce qui permet d'obtenir des préparations très claires et très propres, où levures et bactéries apparaissent seules.

II

Notre premier soin, une fois ces constatations préalables faites, fut de conserver dans notre laboratoire des échantillons qui puissent être toujours comparables entre eux. Nous avons donc distribué dans un grand nombre de tubes à essai, puis stérilisé à l'autoclave à 115° pendant 10 minutes, deux litres d'un même lait de vache. Ces tubes, ensemencés ensuite au fur et à mesure des besoins, nous ont servi pour tous nos essais.

Puis nous avons procédé à la séparation des espèces et à leur isolement en culture pure. Mais dès le début nous avons eu à surmonter certaines difficultés assez inattendues. Dans nos premiers ensemencements, faits par dilutions successives, sur des tubes inclinés de gélose au bouillon de bœuf salé et peptonisé, les deux levures se développaient seules après 24 heures d'étuve à 37°.

Les deux bacilles et le diplocoque n'apparaissaient pas sur ce milieu de culture. Pensant que ces espèces réfractaires étaient peut-être des anaérobies stricts, nous avons fait des cultures

dans la profondeur de la gélose préalablement glycosée à 2,5 0/0 selon la méthode de Liborius modifiée par Veillon.

Nous avons fait, en général, 6 à 8 dilutions successives, de manière à obtenir des colonies bien séparées, et nous avons répété les ensemencements un grand nombre de fois avec des échantillons divers. Nous avons obtenu des tubes constitués de la manière suivante :

Les deux centimètres supérieurs de la gélose étaient occupés par de grosses colonies d'un jaune ambré, discoïdes, à bords nets, à développement rapide, et par d'autres, à développement plus rapide encore, qui poussaient autour d'elles des prolongements ramifiés élégants, en forme de houppes. Les premières étaient constituées par la levure ovoïde, les secondes par la levure allongée, ce que l'on vérifiait facilement par repiquage sur gélose ordinaire en surface.

Au-dessous de la zone limite, ces deux espèces disparaissaient complètement. En revanche, on en distinguait d'autres, beaucoup plus petites, et à développement précaire. Les unes, nuageuses, transparentes, extrêmement frêles, répondaient au gros bacille si abondant sur les préparations de leben. Les autres, opaques, nettes, sphériques, répondaient au diplocoque. Tardivement on voyait apparaître dans la profondeur quelques colonies analogues d'aspect à celles de la levure ovoïde, mais qui, à l'examen microscopique, se montraient constituées par le bacille fin et rare.

Nous retrouvions donc dans ce milieu les cinq espèces que nous avait révélées le microscope. En coupant à un niveau convenable le tube de Liborius, nous avons pu repiquer dans des tubes nouveaux et y obtenir des cultures pures des deux bacilles et du diplocoque. Nous eûmes la surprise de voir que les trois espèces se montraient aérobies facultatives. Mais elles ont obstinément refusé de pousser en surface sur des tubes de gélose ordinaire en surface. Il en fut de même pour le bouillon de bœuf peptonisé salé et pour le lait.

Nous n'avons pu les isoler facilement qu'en profitant de l'aérobiose exclusive des levures. Du lait stérile, privé d'air par l'ébullition, fut ensemencé avec du leben et mis dans un tube de Pasteur que nous scellâmes, après vide fait à la trompe. Le lendemain, après un séjour de 24 heures à l'étuve, le lait

était coagulé, mais l'examen microscopique n'y révélait plus que des bacilles et des diplocoques : les levures avaient entièrement disparu. Nous répétâmes encore une fois l'expérience, et nous fîmes avec ce leben cultivé dans le vide des ensemencements sur gélose glucosée, mais au contact de l'air. Le lendemain, nous avions à la surface de notre gélose, à l'exclusion de toute colonie de levures, deux sortes de colonies :

Les unes, irrégulières, d'un blanc argenté, ressemblaient à de petits flocons de givre; elles se montrèrent constituées par un bacille gardant le Gram, qui, semé dans du lait, le fit coaguler en moins de 24 heures, et qui était identique à notre premier bacille.

Les autres, rondes, convexes, chatoyantes, translucides, bleuâtres par transparence, répondaient à notre deuxième bacille. Semé dans du lait, ce microorganisme le rendit rapidement acide, mais sans le faire coaguler.

Restait le diplocoque, qui, malgré plusieurs tentatives réitérées, refusait de pousser sur ce milieu. Nous l'avons obtenu facilement, au contraire, en semant le leben débarrassé de ses levures sur de la gélose lactosée à 2 0/0. Il y donna des colonies opaques, d'un blanc laiteux, très analogues à celles du streptocoque pyogène, qui se laissèrent repiquer facilement ensuite sur gélose glucosée. Cette difficulté que présente le diplocoque à pousser d'emblée sur la gélose glucosée en surface est d'autant plus paradoxale que ce microbe pousse fort bien, et d'emblée, dans la profondeur de ce milieu, disposé comme dans les tubes de Liborius. Semé dans du lait, il l'acidifie et le coagule en moins de 24 heures.

Nous avions donc, à partir de ce moment, les cinq microorganismes du leben isolés en culture pure. Ces isolements, recommencés plusieurs fois avec des échantillons différents, nous ont toujours fait aboutir aux mêmes résultats. Enfin, si nous ensemencions du lait stérilisé avec les cinq microorganismes provenant de nos cultures, nous obtenions, après quelques tâtonnements, un lait caillé identique au leben comme aspect, comme goût et comme composition chimique.

Parmi ces cinq microorganismes, deux seulement, le gros bacille — *streptobacillus lebenis* — et le diplocoque — *diplococcus lebenis* — font coaguler le lait. Ils produisent en même temps

de l'acide lactique. Nous verrons tout à l'heure que la coagulation se produit également lorsqu'on neutralise l'acide lactique au fur et à mesure de sa production, et que ces deux microbes sécrètent une présure.

Quant aux deux levures dont l'une est une levure vraie, — *saccharomyces lebenis*, — et l'autre, la plus allongée, un mycoderme, — *mycoderma lebenis*, — elles ne sont ni l'une ni l'autre capables de faire fermenter le lactose. Semées dans du lait, à l'état de pureté, elles s'y multiplient faiblement sans produire d'alcool. Mais elles font fermenter toutes deux énergiquement le sucre interverti. Il y avait donc lieu de supposer que l'un quelconque des autres microorganismes sécrétait une invertine du lactose. Nous avons cru d'abord que ce rôle était dévolu au bacille fin — *bacillus lebenis* — et nous avons constaté en effet qu'en sa présence le sucre de lait subit la fermentation alcoolique. Mais le streptobacille est à ce point de vue bien plus actif encore.

On voit que le rôle de chacun des microorganismes dans cette fermentation symbiotique méritait d'être étudié d'un manière détaillée. C'est ce que nous avons tenté de faire.

III

Nous allons donner d'abord la description aussi complète que possible de chacune des espèces.

§ 1. — *Streptobacillus Lebenis.*

C'est un bâtonnet rectiligne, à bouts carrés, immobile, dépourvu de cils vibratiles et de capsule, long de 6 à 8 μ en moyenne, épais de 1/2 μ. Il forme volontiers, dans les milieux liquides (bouillon), des chaînes assez longues, où il peut être malaisé de distinguer chaque article. Sur les préparations colorées par la fuchsine phéniquée à froid on voit très bien, au contraire, un espace clair entre les éléments. Dans ces chaînes, qui ont une tendance à se grouper parallèlement par faisceaux, on rencontre parfois des articles très allongés qui atteignent jusqu'à 18 μ. Dans les cultures anciennes, ces dimensions sont de beaucoup dépassées : le bacille s'allonge, s'épaissit, prend des formes bos-

suées en massue; la trame protoplasmique, d'homogène qu'elle paraissait, devient granuleuse et prend irrégulièrement la couleur.

Il s'agit alors de formes de régression. D'autres fois, dans certaines cultures en bouillon, on trouve des flocons constitués par un véritable chevelu de bacilles extrêmement contournés; là encore, à côté de filaments d'épaisseur normale, on en trouve d'autres beaucoup plus épais.

Dans le lait, comme à la surface de la gélose lactosée ou glucosée ces formes filamenteuses manquent; le microbe s'y présente en bâtonnets d'épaisseur constante, de longueur peu variable, presque toujours isolés ou formant des chaînes très courtes.

Le meilleur moyen de le conserver vivant, est de le cultiver dans du lait à la température ordinaire. Il suffit alors de le repiquer tous les mois. Sa vitalité est précaire dans la profondeur de la gélose sucrée. Deux ou trois jours après que les colonies sont devenues visibles à l'œil nu, les réensemencements en demeurent stériles. Il en est de même, à peu de chose près, à la surface de la gélose sucrée. Au début, lors de la séparation des espèces, l'acclimatement du microbe à ce milieu peut même être — selon les échantillons — très difficile. Il arrive que le bacille pousse sur la gélose lactosée ou glucosée en même temps que les autres microbes, mais que les repiquages sur ce même milieu, pour l'obtention de cultures pures, demeurent obstinément stériles. Ou bien l'on parvient à obtenir une première culture pure qui ne se laisse pas réensemencer. Il faut alors faciliter l'acclimatement en faisant repasser le microbe par le milieu qui lui est favorable, le lait. On finit ainsi par l'accoutumer à pousser sur la gélose sucrée et dans le bouillon sucré : il y vit huit jours ou même un peu plus à la température ordinaire. A l'étuve il pousse plus vite, mais meurt beaucoup plus rapidement. Les réensemencements doivent toujours être faits largement, sous peine de demeurer stériles.

Toutes les couleurs d'aniline colorent le streptobacille. Le procédé, de Gram qui colore admirablement le bacille vivant le décolore, au contraire, lorsqu'il est mort. C'est une épreuve utile qui permet de prévoir à coup sûr si tel réensemencement fait en prélevant sur telle culture sera oui ou non fertile. Tant qu'il reste sur la préparation quelques éléments colorés, et pourvu qu'on sème sur un milieu favorable (lait), on sera assuré d'un résultat positif.

Sur la surface de la gélose lactosée ou glucosée, on obtient, en 48 heures d'étuve à 37°, des colonies, qui, à l'œil nu, présentent l'aspect suivant : ce sont de petites taches plates, à contours irréguliers, à surface irrégulière, — presque complètement incolores par réflexion, à ce

point qu'on les distingue à peine du milieu, — d'un gris pâle légèrement bleuâtre par transparence. Elles sont translucides; il semble que leur surface grise soit traversée de stries brillantes. L'éclat argenté de ces colonies, l'irrégularité de leurs bords et de leur surface les fait ressembler à de petits flocons de neige en train de fondre.

Examinées sous le microscope à un faible grossissement (Zeiss : obj. 16 ‰, aper. 0,30 ; ocul. n° 2), ces colonies semblent composées de circonvolutions irrégulièrement incurvées et enchevêtrées, que séparent des sillons. Leur couleur est brune au centre et se perd vers les bords.

Ces colonies augmentent peu de grandeur. Il est bien rare que, dans des tubes où elle sont très isolées, elles atteignent 4 ‰ de diamètre. Le plus communément, elles restent à 1,5 ou 2 ‰.

Dans la profondeur de la gélose sucrée (tubes de Liborius), les colonies du streptobacille sont de consistance extrêmement ténue; elles ont l'air sur le point de se dissoudre dans le milieu; transparentes, prenant la couleur de la gélose, elles ont un aspect nuageux, des contours mal définis.

Sur la gélose ordinaire au bouillon salé peptonisé, sans addition de sucre de raisin ou de sucre de lait, le bacille, comme nous l'avons vu, refuse absolument de pousser. Il en est de même sur la gélatine ordinaire, en stries ou en piqûres. Pour s'assurer si la trypsine est au nombre des ferments qu'il produit, il faut le semer par piqûres dans la gélatine lactosée à 2 0/0. Le microbe y pousse mal et très lentement ; la culture ne forme pas une ligne continue ; mais on voit, tout le long de la piqûre, un chapelet de colonies de grosseur variée — jusqu'à une petite tête d'épingle — blanches, très denses, opaques, à bords parfaitement circulaires. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur pomme de terre, il n'y a pas de développement.

Dans le bouillon ordinaire salé peptonisé, le streptobacille refuse de pousser. Dans ce même bouillon additionné de lactose ou de glucose, il pousse, mal au début, puis de mieux en mieux, troublant d'abord le liquide, qui, lorsqu'on l'agite, prend un aspect chatoyant et moiré, puis se précipitant au bout de quelques jours en gros flocons au fond du vase.

Nous l'avons semé aussi dans du petit-lait, obtenu par filtration de lait coagulé par la présure sur une bougie Chamberland à la pression de 4 ou 5 atmosphères. La culture s'y faisait assez mal, demeurait peu abondante et s'épuisait vite.

Nous avons vu déjà que le streptobacillus Lebenis est indifféremment aérobie et anaérobie. Nous l'avons cultivé dans le vide ou dans une atmosphère d'hydrogène, soit dans du bouillon sucré, soit à la

surface de la gélose sucrée. Dans aucune de ces cultures il ne se fait de développement apparent de gaz.

Dans aucune condition, nous n'avons observé de production de spores.

Semé dans du lait, le streptobacillus Lebenis le fait coaguler à l'étuve à 37° en six heures environ. Le lait ainsi coagulé est très nettement acide; le microbe fait en effet subir au sucre de lait la fermentation lactique. Nous avons mesuré cette acidité dans une culture sur petit-lait de 24 heures : elle était de 0gr,261 0/0, exprimée en acide lactique.

Cette quantité d'acide lactique était-elle suffisante pour expliquer la coagulation du lait? Pour nous en assurer, nous avons fait les expériences suivantes. A cinq tubes contenant respectivement 19, 18, 16, 14 et 12 c. c. de lait stérilisé, nous avons ajouté le contenu de tubes renfermant 1, 2, 4, 6 et 8 c. c. d'une solution d'acide lactique à 1 0/0, de manière à avoir dans chaque tube un volume total de 20 c. c. Le tout a été mis à l'étuve à 37° et observé après six heures de séjour. A ce moment, trois tubes sur cinq étaient coagulés. Les tubes furent remis à l'étuve, et retirés de nouveau au bout de 24 heures. Ils avaient conservé le même aspect. Nous avons procédé alors au dosage de l'acidité totale de chacun des tubes mis en expérience afin de tenir compte des pertes de liquide subies par la stérilisation, le transvasement, etc. Voici le tableau des résultats :

Tube n° 1	acidité exprimée en a. lactique °/₀	= 0,215 :	lait non coagulé.
2	»	= 0,342 :	»
3	»	= 0,558 :	coagulation peu nette.
4	»	= 0,720 :	coagulation nette.
5	»	= 0,990 :	»

Ainsi notre streptobacille coagule le lait avec une acidité de 0,26 0/0, tandis qu'une acidité de 0,34 0/0 ne produit pas le même effet en l'absence de microorganisme. Le caillot produit par l'acide lactique seul est d'ailleurs différent comme aspect : il est plutôt constitué par des grumeaux nettement séparés de la portion séreuse, tandis que, sous l'influence du streptobacille, le lait se prend en un seul bloc.

Nous avons encore, reprenant une expérience faite par Freudenreich pour déceler la production de caséase par des ferments lactiques, cultivé notre bacille dans du lait additionné d'une grande quantité de carbonate de chaux, afin de neutraliser l'acide lactique au fur et à mesure de sa production. Dans ces conditions, le lait se coagule à l'étuve en moins de 24 heures.

Il faut donc admettre que notre bacille, tout ferment lactique qu'il est, sécrète une présure. En revanche il ne sécrète pas de caséase. Des tubes que nous avons conservés pendant des mois ont été retrouvés inaltérés, et nous n'avons pu, par nos analyses, y déceler de peptones.

§ 2. — *Bacillus Lebenis.*

C'est un bacille très mince, long de 2 à 6 μ, parfois un peu incurvé, immobile, dépourvu de cils vibratiles et de capsule. Il se présente ordinairement sous formes d'éléments isolés, forme des amas lorsqu'on le cultive sur des milieux solides, mais jamais de chaînes. Il arrive que, dans les cultures un peu anciennes dans le lait, on trouve deux ou trois bacilles bout à bout, donnant l'aspect d'un petit filament plus ou moins incurvé.

On n'observe pas de formes monstrueuses, et le microbe reste en somme très identique à lui-même dans les différents milieux. Dans le lait ou le petit-lait il a parfois un aspect granuleux, qui le fait ressembler au bacille de la tuberculose, dont le rapprochent d'ailleurs sa forme et ses dimensions.

Il est moins délicat que le streptobacille, et se conserve beaucoup plus longtemps dans les milieux artificiels. Il ne produit pas de spores. Indifféremment aérobie ou anaérobie, il partage avec le streptobacille la propriété de ne pousser que sur des milieux sucrés.

Comme lui il garde le Gram tant qu'il est vivant, et le perd sitôt qu'il est mort. Les éléments individuels paraissent mourir assez vite, mais les colonies mettent longtemps à épuiser les ressources nutritives des milieux. Aussi peut-on voir sur des préparations de colonies relativement jeunes (48 à 72 heures) des éléments tout à fait incolores à côté de bacilles bleu foncé.

Sur la surface de la gélose lactosée ou glucosée, les colonies apparaissent au bout de 24 heures d'étuve sous forme de petits points transparents, presque incolores, en goutte de rosée, et au bout de 48 heures elles ont pris leur aspect caractéristique : ce sont alors, vues par réflexion, des taches convexes, d'un blanc transparent très légèrement jaunâtre, à bords nettement circulaires, à surface humide et brillante. Vues par transparence, elles sont, au contraire, d'un bleu porcelainé intense et offrent souvent des irisations. L'éclat de leur surface est remarquable; il arrive que, dans certains tubes, les colonies aient toutes l'aspect qu'offrent des grains de fécule examinés à la lumière polarisée, et que l'on voie à leur surface comme une croix de Malte chatoyante. Elles atteignent et ne dépassent guère 2 à 3 millimètres de diamètre.

A un faible grossissement, les colonies très jeunes ont l'aspect de gouttes de rosée et forment de petites taches rondes, incolores, à bords parfaitement circulaires. Plus tard, elles ont une teinte jaune qui peut même devenir assez foncée et qui est surtout marquée vers le centre beaucoup plus épais. Un mince liséré incolore semble entourer ce noyau central et se limite par un rebord granuleux. Toute la surface de la colonie paraît d'ailleurs finement granuleuse. Dans le cas où l'on a l'aspect en croix de Malte décrit plus haut, on voit que les colonies ont l'air d'être composées de couches concentriques imbriquées, rappelant l'aspect d'un bulbe d'oignon coupé perpendiculairement à son axe, ou d'une coupe de grain d'amidon. Il s'agit probablement d'une déshydratation inégale des différentes zones de la colonie.

Dans la profondeur de la gélose sucrée, le bacille donne des colonies opaques, jaunâtres, sphériques ou discoïdes, à bords nets.

Lorsqu'on le sème par piqûre dans la gélatine lactosée, on voit bourgeonner tout autour du canal de piqûre une série continue de petites colonies blanches, rondes, très régulièrement disposées, et paraissant fixées au canal central comme un grain de raisin sur la grappe. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Dans le bouillon lactosé ou glucosé, il se forme dès le 2e jour un trouble uniforme abondant, qui donne au liquide, lorsqu'on l'agite, un aspect chatoyant. Il se produit de l'acide lactique.

Il en est de même dans le petit-lait, où le bacille pousse admirablement, trouble le liquide, et donne au bout de 48 heures un abondant dépôt blanchâtre. Il y développe, en 24 heures, une acidité de 0,216 0/0 exprimée en acide lactique.

Le lait, où le microbe pousse fort bien, n'est jamais coagulé.

Il n'y a pas de développement sur pomme de terre.

§ 3. — *Diplococcus Lebenis.*

Il se présente toujours par deux. Les chaînes sont nettement composées de diplocoques, souvent en voie de division, et dont les éléments sont aplatis dans le sens de la longueur, comme le gonocoque. Les éléments sont assez gros, 1/3 μ de diamètre environ. Dans le leben, on ne trouve guère que des diplocoques; mais dans les cultures pures, sur lait, on trouve déjà de courtes chaînes.

Dans le petit-lait, les chaînes peuvent devenir très longues : nous en avons compté de plus de cent éléments.

Le diplocoque se colore bien par toutes les couleurs d'aniline et reste d'un beau bleu-noir après la réaction de Gram. Mais les éléments morts se décolorent par cette réaction.

Sur la gélose lactosée, les colonies apparaissent au bout de 24 heures sous forme de gouttelettes un peu aplaties, d'un blanc sale, translucides; leurs bords ne sont pas tout à fait circulaires. Elles sont souvent de taille inégale dans un même tube.

A un faible grossissement, ce sont des disques jaunâtres, à surface un peu villeuse, sans rien de bien caractéristique. Les colonies un peu vieilles sont plus foncées, presque brunes, et ont des contours plus flous; elles ont un aspect spongieux.

Dans la profondeur de la gélose sucrée, les colonies représentent de petites sphères blanches, à surface lisse, opaques.

Dans la gélatine lactosée, par piqûre, la culture se fait mal et son développement s'arrête au bout de peu de jours. Le long du canal de piqûre s'échelonnent, séparées par de petits intervalles, de très petites colonies rondes, blanches par réflexion, brun sombre par transparence, à bords parfaitement nets. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Dans le bouillon sucré, il se fait un développement abondant et rapide; le liquide se trouble, et un précipité granuleux, cohésif, d'un blanc grisâtre, se dépose au fond du tube.

Il pousse également bien dans le petit-lait, et il y développe des matières volatiles à odeur de fromage, ainsi que de l'acide lactique (0,396 0/0 en 24 heures).

Le lait est rapidement coagulé. Le microbe, comme le streptobacille, sécrète une présure qui coagule la caséine, comme on peut s'en assurer en neutralisant l'acide lactique par du carbonate de chaux, au fur et à mesure de sa production.

Le diplocoque Lebenis ne donne pas de spores. Sa vitalité est assez grande. On peut le conserver dans du lait pendant plusieurs mois.

§ 4. — *Saccharomyces Lebenis.*

C'est une levure vraie, dont les grains de forme ovoïde ont un grand diamètre variant entre 3 et 6 μ, un double contour net, un contenu granuleux. Les éléments sont en général isolés, très rarement par deux; les bourgeons se détachent très jeunes. Nous n'avons jamais observé de formes mycéliennes. Le S. Lebenis a une longue vitalité, et nous en avons pu faire des réensemencements fertiles au bout de plusieurs mois. Nous n'avons jamais pu obtenir de spores, ni en laissant séjourner de la levure sur des filtres, ni en la cultivant sur des cylindres de plâtre.

Toutes les colorations par les couleurs basiques d'aniline réussissent. La méthode de Gram donne une belle teinte bleu foncé. La

persistance de la réaction ne nous a pas paru être aussi nettement en rapport avec la vie du microorganisme que pour les bactéries décrites plus haut.

Lorsqu'on cultive le S. Lebenis, provenant directement du leben, dans de la gélose sucrée en profondeur, il se montre aérobie strict et ne pousse absolument que dans la zone supérieure de la colonne de gélose. Nous avons vu que du lait ensemencé avec du leben et cultivé dans un tube de Pasteur bien purgé d'air à la trompe se coagule, mais que l'on n'y trouve au bout de 24 heures ni saccharomyces, ni mycoderma Lebenis. On peut ainsi se débarrasser complètement de ces deux microorganismes.

Pourtant cette aérobiose stricte n'est pas une propriété constante du Saccharomyces. Nous verrons, en effet, qu'il fait fermenter un certain nombre de sucres, et cette fermentation, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, se produit aussi bien à l'abri qu'au contact de l'air. Si l'on resème sur gélose sucrée en profondeur de la levure venant de faire fermenter du moût de raisin par exemple, on verra les colonies de Saccharomyces se développer du haut en bas du tube : pourtant les colonies de la zone supérieure sont notablement plus grosses et plus serrées que celles de la zone privée d'air, qui forment un nuage extrêmement fin.

Le S. Lebenis pousse bien sur gélose ordinaire non sucrée. Il y donne au bout de 48 heures d'étuve de petites colonies blanches, assez transparentes, à bords nettement circulaires, à surface humide et convexe. Ces colonies n'augmentent guère de dimension dans les jours suivants, et ne dépassent pas 3 millimètres de diamètre. A un grossissement faible, elles se présentent sous l'aspect de taches jaunes, à bords parfaitement circulaires, à surface convexe finement granuleuse.

A l'intérieur de la gélose sucrée, ce sont des colonies blanches, discoïdes ou sphériques, compactes, denses, opaques, à surface parfaitement nette, qui peuvent atteindre d'assez grandes dimensions.

Dans la gélatine sucrée, il se développe, le long du canal de piqûre, un chapelet de fines colonies rondes ou ovales, étroitement serrées les unes contre les autres; dans le haut du tube, ces colonies poussent des ramifications sous forme de houppes serrées; ces ramifications ne dépassent pas 3 ou 4 millimètres et sont fort épaisses. Il ne se produit aucune liquéfaction.

Cultivé dans du bouillon lactosé, il pousse assez bien, trouble le liquide, et se dépose dans le fond du vase, sans donner lieu à la fermentation alcoolique. Il en est de même dans le petit-lait. La levure vit dans le lait qui reste inaltéré.

Nous l'avons cultivé dans du moût de raisins secs contenant 19 gr. 0/0

de glucose, et ayant une acidité totale équivalant à 2gr,142 0/0, exprimée en acide oxalique. Il s'y développe très bien, trouble le liquide, puis se dépose abondamment au fond du vase, en donnant lieu à une effervescence très active. La fermentation paraît se faire un peu plus énergiquement à l'étuve, mais elle dure alors moins longtemps. Au bout de 36 jours à la température ambiante du laboratoire (environ 26° C.) la fermentation était généralement terminée. L'examen du moût pratiqué au bout d'un semblable délai nous a donné les résultats suivants :

Odeur agréable de fruits : le liquide s'est clarifié et sa couleur a passé du brun à un beau jaune d'or. Analyse chimique :

Glucose	0 gr. 982 0/0	
Acidité totale	0 — 49 —	en acide oxalique.
Acides fixes	0 — 46 —	id.
Acides volatils	0 — 03 —	en acide acétique.
Alcool éthylique	11° 2 —	en volume.

Si le Saccharomyces Lebenis est incapable de faire fermenter le lactose, il a pourtant la propriété de faire fermenter d'autres disaccharides, entre autres le saccharose et le maltose.

Semé dans une solution de saccharose à 10 0/0, il s'y est développé assez lentement d'abord, et n'a commencé à produire d'effervescence qu'au bout de 11 jours. Le liquide exactement neutralisé a été distillé 13 jours après ; le distillat a donné les principales réactions de l'alcool vinique (formation de cristaux caractéristiques d'iodoforme, etc....) Le milieu sucré contenait 7 gr,125 0/0 de sucre *interverti*, le reste du sucre ayant subi la fermentation alcoolique.

Notre levure intervertit donc le saccharose, mais laisse le lactose inaltéré.

Semée dans le moût de bière, elle y provoque une fermentation extrêmement énergique, et agit comme levure haute.

Pour qu'une fermentation alcoolique se développe dans des milieux lactosés où l'on a semé notre levure, il faut qu'elle s'y trouve en symbiose avec d'autres microorganismes.

Nous avons ensemencé du bouillon lactosé à 2 0/0 avec le saccharomyces et le streptobacillus, et nous avons vu se produire une fermentation très nette. Au bout de plusieurs semaines, le bouillon a été distillé après neutralisation. Traité par une solution de potasse et la liqueur iodo-iodurée, le distillat nous a donné une odeur nette et des cristaux d'iodoforme nombreux. La même expérience faite sur un bouillon où avaient poussé simultanément la levure et le *bacillus Lebenis* a donné une odeur faible d'iodoforme, mais pas de cristaux.

Enfin la réaction de Lieben et demeurée complètement négative avec du bouillon lactosé ensemencé avec le diplocoque et le saccharomyces.

C'est donc le streptobacillus et accessoirement le bacillus Lebenis qui permettent à notre levure de faire dans le lait de la fermentation alcoolique. Nous reviendrons tout à l'heure sur cette coopération.

§ 5. — *Mycoderma Lebenis.*

Les éléments se rencontrent isolés ou groupés en mycélium. Dans le premier cas, leurs dimensions oscillent entre 6 et 12 μ de longueur sur environ 3 μ de large ; dans le second, on voit les articles s'allonger et s'amincir, et atteindre 33 μ et plus sur 1,5 ou 2 μ d'épaisseur. Souvent il semble que les extrémités arrondies des individus isolés soient un peu renflées, en biscuit. Dans les arrangements mycéliens cette forme ne s'observe pas : les articles se disposent bout à bout en s'étirant pour ainsi dire, et les bourgeons latéraux donnent naissance à des chaînes secondaires se détachant à angle presque droit. Les deux aspects se rencontrent dans le leben.

Examinés vivants sans coloration, les éléments se montrent entourés d'un double contour : leur protoplasma finement granuleux contient souvent d'assez grosses vacuoles. Ils se colorent bien par les couleurs d'aniline, et conservent bien le violet après la réaction de Gram. La vitalité est grande; nous n'avons pu obtenir de spores sur cylindres de plâtre.

Vis-à-vis de l'oxygène, le M. Lebenis se comporte absolument comme le saccharomyces précédemment étudié.

Cultivé sur gélose ordinaire en surface, il donne des colonies d'un blanc grisâtre, opaques, crémeuses, peu surélevées, à surface humide. Les bords des colonies jeunes sont assez régulièrement circulaires : plus tard ils se dentèlent, en même temps qu'apparaît une sorte de stratification en zones concentriques. Les colonies, dans le même tube, atteignent des dimensions assez variables. Pourtant, c'est en moyenne l'espèce qui fournit les plus grosses colonies parmi les cinq microorganismes du leben. On en voit qui ont 6 à 8 millimètres de diamètre. Examinées à un faible grossissement, elles sont de couleur grise, plus accentuée au centre; toute la surface est villeuse, presque épineuse. Sur gélose sucrée ou lactosée, le mycoderme pousse mieux encore et donne des colonies plus grosses.

Dans la profondeur de la gélose sucrée, les colonies exclusivement aérobies prennent une couleur d'un gris verdâtre, et leur centre s'entoure d'un chevelu très ramifié, s'étendant assez loin, et que le microscope montre composé d'arborisations très élégantes.

Semé par piqûre dans la gélatine lactosée, il donne tout le long du canal un développement très abondant près de la surface, de moins en moins abondant à mesure qu'on va vers le fond, — en sorte que la culture a la forme d'un cône à base supérieure. Le long de la piqûre s'égrènent de petites colonies rondes, blanches, d'où part un chevelu ramifié très délicat qui se dirige perpendiculairement à l'axe du tube, et qui, tout à fait en haut, occupe toute la largeur de la colonne de gélatine. A la surface même de la gélatine, il se forme une sorte de couche croûteuse, mince, sèche, nacrée, beaucoup plus consistante et continue à la périphérie qu'au centre, où elle semble divisée en îlots. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Semé dans du bouillon lactosé, le mycoderme pousse assez mal, en donnant un voile très mince et transparent, grisâtre, fragile, qui s'accole aux parois du vase et que l'agitation fragmente facilement. Le liquide est légèrement troublé et il se fait un dépôt au fond du tube. Il ne se produit pas de fermentation. Il en est de même dans le petit-lait.

Dans le moût de raisins secs au contraire, la culture est active et la fermentation alcoolique manifeste ; il se produit un voile plus épais que celui des cultures en bouillon, voile duquel des masses microbiennes grumeleuses tombent peu à peu au fond du vase. Tout le liquide finit par être trouble, mais le développement le plus abondant se fait toujours à la surface, et il finit par y avoir de très gros flocons au fond du vase. La fermentation, à la température ordinaire, se poursuit pendant une quinzaine de jours environ, puis diminue beaucoup d'intensité et finit par s'arrêter.

Un moût examiné au bout de 37 jours possédait une odeur plus aigre et moins agréable que celle du moût fermenté par le saccharomyces, et était de nuance plus claire. L'analyse y décelait :

Glucose	0 gr. 67 0/0	
Acidité totale	0 — 42	— en a. oxalique.
Acides fixes	0 — 38	— —
— volatils	0 — 036	— en a. acétique.
Alcool éthylique	9 —	— en volume.

Semé dans une solution de saccharose, le mycoderme y pousse assez mal, mais n'y produit ni fermentation alcoolique, ni interversion du saccharose.

En revanche, il attaque le maltose et fait fermenter, bien que faiblement, le moût de bière.

Dans le bouillon lactosé, la présence du streptobacille, et, à un moindre degré, du bacille, permet au mycoderme de faire fermenter le sucre de lait.

IV

Ces cinq microorganismes sont-ils bien les agents de la fermentation du leben? leur action est-elle seule en jeu? Pour le prouver, il fallait fabriquer du leben au moyen de nos cultures pures, et s'assurer de l'identité de composition chimique de ce produit artificiel et du leben ordinaire.

On obtient souvent du leben qui ne diffère en rien de celui qu'on mange en Égypte en semant simplement les cinq microorganismes dans du lait bouilli ou stérilisé, et en laissant à l'étuve pendant quelques heures. Mais on n'y réussit pas toujours. Il arrive que les bactéries coagulantes se développent trop vite et trop abondamment, par rapport aux blastomycètes. Il est probable que ceux-ci, pour n'avoir pas été semés en quantité suffisante dès le début, sont englobés dans les flocons de caséine et que la fermentation alcoolique s'en trouve gênée.

Pour agir à coup sûr, on peut semer d'abord dans le lait les deux blastomycètes avec le bacillus Lebenis, qui rend possible la fermentation, sans coaguler la caséine. On sème ensuite le streptobacille et le diplocoque, lorsque les premiers microorganismes ensemencés ont eu le temps de se développer. De cette façon, l'équilibre microbien s'établit plus aisément et chacun des agents de fermententation se développe selon la proportion la plus favorable.

Il se produit là quelque chose d'analogue à ce que l'on observe dans la fabrication artificielle de kéfir dont la fermentation a tant d'analogie avec celle qui fait l'objet de ce travail. Freudenreich [1], qui a fait récemment du kéfir une étude bactériologique approfondie, explique par des raisons semblables aux nôtres les échecs fréquents, surtout au début, qu'il rencontra en ensemençant du lait avec des cultures pures de ferments de kéfir.

Nous avons montré que le streptobacille et le diplocoque, tout ferments lactiques qu'ils sont, n'en sécrètent pas moins une présure, et qu'ils sont donc à la fois ferments du lactose et ferments de la caséine. Nous n'avons pu isoler cette présure. Nos essais nous ont montré qu'elle se laisse arrêter par les filtres poreux,

1. Ed. V. Freudenreich, Bacteriologische Untersuchungen über den Kéfir, *Centralblatt f. Bacteriologie*. II Abth., 1897 N° 2 et suiv.

et nous n'avions pas à notre disposition d'autres moyens pour chercher à l'isoler. Mais sa présence est attestée par les expériences que nous avons rapportées plus haut. Freudenreich avait montré déjà que certains ferments lactiques sécrètent de la caséase. Nos recherches établissent qu'il existe aussi des microorganismes capables de faire subir au lactose la fermentation lactique, tout en sécrétant une présure, fait que l'on n'avait pas, croyons-nous, constaté jusqu'ici. D'autre part, contrairement à la règle ordinaire, nos bactéries présurantes ne sécrètent pas de caséase.

Les modifications chimiques subies par le lait sous l'action des ferments du leben sont donc très analogues à celle qu'il subit dans l'estomac du nourrisson, où il se coagule sous la double influence des acides et de la présure.

Mais il s'y ajoute une autre action, dont la résultante est la production d'alcool. Si notre saccharomyces et notre mycoderme faisaient subir au lactose la fermentation alcoolique, le problème serait par là même résolu. Mais nous avons vu qu'il n'en est rien. Nos deux blastomycètes font fermenter le glucose et le maltose, mais non pas le lactose. Notre saccharomyces est même capable d'intervertir le saccharose, pour faire ensuite fermenter le glucose ainsi obtenu. Mais il laisse le lactose inaltéré.

En présence du streptobacille, au contraire, nos deux blastomycètes produisent dans un milieu lactosé la fermentation alcoolique. Freudenreich avait de même isolé dans le kéfir une bactérie (streptococcus *b*) qui permet à la levure du kéfir de faire fermenter le lactose, et il suppose que le rôle de ce streptocoque consiste à dédoubler le lactose en monosaccharide. C'est là aussi l'hypothèse que nous avions faite pour interpréter l'action de notre streptobacille. Nous avons cherché à en avoir la vérification chimique et, avec l'aide de M. Gillet, pharmacien à l'hôpital des Enfants-Malades, nous avons analysé une culture pure de streptobacille dans du bouillon lactosé à 2 0/0. Après avoir déféqué le bouillon au moyen du sous-acétate de plomb, et enlevé l'excès de plomb par le carbonate de soude, nous avons traité le liquide ainsi obtenu par le chlorhydrate de phénylhydrazine en excès en liqueur acétique en présence de l'acétate de soude, au bain-marie pendant environ une heure. Si le bouillon avait contenu du glucose, le glucosazone produit, insoluble dans l'eau à chaud, se serait précipité ; mais en filtrant, et en traitant le filtrat par l'acétone

bouillant, nous n'avons pas obtenu de cristaux par l'évaporation. Dans la liqueur filtrée, devait rester le lactosazone et — par hypothèse — le galactosazone, tous deux précipitables à froid; le précipité fut repris plusieurs fois par l'eau pour le purifier et le faire cristalliser, — mais les cristaux observés étaient du lactosazone, et nous n'avons pu voir de galactosazone, même en reprenant le précipité par l'alcool étendu chaud.

Il ne nous a donc pas été possible — et l'expérience a été répétée à plusieurs reprises — de déceler d'autre sucre que du lactose dans la culture. Il est probable cependant qu'une interversion se produit, mais que les produits de dédoublement subissent aussitôt la fermentation lactique. C'est là du reste la théorie généralement adoptée de cette fermentation. On comprendrait dès lors que la levure se développant dans un milieu où se produisent ces phénomènes puisse faire subir la fermentation alcoolique à une partie du sucre interverti, alors que le reste est aussitôt converti en acide lactique par le streptobacille.

Mais s'il en est ainsi, le diplocoque qui est, lui aussi, un ferment lactique, mais qui ne rend pas le lactose fermentescible pour les levures, attaquerait le sucre de lait directement sans l'intervertir. On voit que le problème se complique singulièrement, et il paraît difficile de le résoudre en l'état actuel de nos connaissances.

D'après ce que nous avons dit des propriétés biologiques des microorganismes du leben, — on voit que le streptobacille et le diplocoque produisent de l'acide lactique et font coaguler le lait par l'action combinée de l'acide lactique ainsi produit et de la présure qu'ils sécrètent. Nous avons vu, de plus, que le streptobacille rend le lait fermentescible pour le saccharomycète et le mycoderme, qui tous deux donnent lieu à la production d'alcool et probablement de quelques autres composés moins bien définis qui contribuent à donner au caillé son arome.

Reste le petit bacille fin, bacillus Lebenis, dont le rôle ne semble pas très clair. Il donne lieu à un peu d'acide lactique, il rend le lactose fermentescible, — à un moindre degré que le streptobacille, — mais son absence dans les lebens que nous avons fabriqués artificiellement ne nous a paru entraîner aucune différence dans les propriétés du produit obtenu. Freudenreich a pu de même produire du kéfir sans l'aide du bacillus Caucasicus que

l'on trouve pourtant dans tous les échantillons de kéfir.

En terminant, nous voudrions encore rappeler cette propriété intéressante de nos bactéries, de ne pousser que sur des milieux sucrés, — propriété qu'ils partagent du reste avec les organismes du kéfir. Cet exclusivisme est le meilleur argument que l'on puisse donner en faveur de leur spécificité, — spécificité acquise par l'accoutumance prolongée à un même milieu, le lait. Il est donc très probable que la symbiose de nos cinq microorganismes remonte à une époque assez lointaine dans le passé, et que c'est au cours d'innombrables réensemencements qu'ils ont acquis quelques-unes de leurs propriétés. On connaît en effet bien peu de microorganismes aérobies pour lesquels le sucre soit une condition *sine qua non* d'existence.
